

## Influencia de los productos de la reacción entre lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal y 4,5 (E)-epoxy-2 (E) -decenal) y lisina sobre la utilización de zinc y calcio: ensayos en células Caco-2

Por Isabel Seiquer y María Pilar Navarro\*

Unidad de Nutrición, Estación Experimental del Zaidín, CSIC.  
C/ Prof. Albareda, 1. 18002, Granada, España.  
Tlf. 958-572757 Fax. 958-572753. E-mail: pnavarro@eez.csic.es

### RESUMEN

**Influencia de los productos de la reacción entre lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal y 4,5 (E)-epoxy-2 (E) -decenal) y lisina sobre la utilización de zinc y calcio: ensayos en células Caco-2.**

Se estudió la influencia de la presencia de productos obtenidos en la reacción de dos lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal, EH, y 4,5 (E)-epoxy-2(E)-decenal, ED) con el aminoácido lisina (EH-L y ED-L), sobre la absorción de zinc y calcio, comparándolos frente a una mezcla de fructosil-lisina (F-L). Los ensayos se realizaron con células Caco-2 sembradas en placas bicamerales. La adición de las muestras EH-L, ED-L y F-L al medio de cultivo supuso una reducción significativa en el Zn transportado a través de la monocapa de células, mucho más marcada ante la presencia de EH-L. También se redujo significativamente la captación celular de Zn, sin diferencias entre las distintas muestras ensayadas. Sin embargo, el transporte de Ca no se vio modificado. Por lo tanto, los productos pardos lípido-aminoácidos ensayados parecen afectar negativamente la disponibilidad del Zn, sin tener efectos notables sobre la del Ca.

**PALABRAS-CLAVE:** Calcio - Células Caco-2 - Lípidos oxidados - Reacción lípido-aminoácido - Zinc.

### SUMMARY

**Effects of oxidized lipids (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal and 4,5 (E)-epoxy-2 (E) -decenal) and lysine reaction products on zinc and calcium utilization: assays in Caco-2 cells.**

The influence of the presence of brown products from the reaction between two oxidized lipids (4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal, EH, and 4,5 (E)-epoxy-2 (E)-decenal, ED) and lysine (EH-L and ED-L) on zinc and calcium utilization was studied, and compared with a fructosyl-lysine mixture (F-L). Assays were carried out in Caco-2 cells grown in bicameral chambers. The Zn transported across the cell monolayer was significantly lower in the presence of the EH-L, ED-L and F-L samples, specially with EH-L. Significant decreases in Zn uptake were also observed, with no differences between samples. However, calcium transport was not modified. Thus, the assayed lipid-aminoacid brown products seem to have negative effects on Zn availability, whereas Ca availability appears to be unaffected.

**KEY-WORDS:** Caco-2 cells - Calcium - Lipid-protein reaction - Oxidized lipids - Zinc.

### 1. INTRODUCCIÓN

Durante el procesado y la conservación de alimentos se producen multitud de reacciones entre

distintos componentes, muchas de ellas favorecidas por el calor. Entre éstas, las más frecuentes son las reacciones de pardeamiento no enzimático, siendo la más típica la Reacción de Maillard (RM) que se desarrolla fundamentalmente entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carbonilo de un azúcar reductor, dando lugar normalmente a compuestos pardos, a menudo perseguidos en la preparación de los alimentos por conferir características organolépticas de color, aroma y sabor agradables. Además de los azúcares reductores, otros compuestos carbonilos, particularmente los de los lípidos oxidados, son capaces de reaccionar con los grupos amino en reacciones tipo Maillard, dando lugar a pigmentos macromoleculares pardos (Hidalgo et al., 1992; Zamora e Hidalgo, 1994, 1995).

La peroxidación de los lípidos se ve acompañada de la formación de diversos compuestos, entre los que se encuentran multitud de aldehídos procedentes de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) muy distintos y obtenidos a través de diferentes rutas. Entre estos aldehídos se ha descrito el desarrollo de 4,5-epoxy-2-alquenes, principalmente 4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal (EH) y 4,5 (E)-epoxy-2 (E) -decenal (ED) (Swoboda y Peers, 1978; Gardner y Selke, 1984). El EH es un producto de la oxidación de ácidos grasos n-3 pentaenoicos, obtenido por un mecanismo que parece común para diferentes PUFAs. Así, cuando el producto inicial de la reacción es el ácido linoleico (C18:2n6), el epoxialquenal que se obtiene es el ED. Ambos aldehídos son capaces de reaccionar con los grupos amino, los aminoácidos y las proteínas, dando lugar a compuestos de naturaleza pirrólica que poseen color y fluorescencia (Zamora e Hidalgo, 1994, 1995).

Entre las consecuencias fisiológicas y nutritivas de los productos de pardeamiento no enzimático, la más conocida y aceptada es la pérdida del valor nutritivo de los alimentos, centrada fundamentalmente en la proteína y sus aminoácidos (Mauron, 1985). Es conocido que en diversos tratamientos culinarios e industriales de los alimentos, especialmente de los ricos en grasa, pueden desarrollarse fenómenos de

peroxidación lipídica con formación de compuestos poliméricos (Pokorny, 1980), que pueden afectar a la proteína disminuyendo la disponibilidad e incluso el contenido de algunos aminoácidos (Beamonte y Castrillón, 1989). Durante el deterioro proteico producido por los lípidos peroxidados, el aminoácido que se altera en mayor grado es la lisina (Karel, 1984). Así, en ensayos realizados calentando caseína con aceite a 110°C durante 90 minutos, se han observado descensos significativos en los valores de lisina disponible (Navarro et al., 1988).

Además de los efectos negativos en el valor biológico de la proteína de la dieta, en los últimos años se viene prestando especial atención al efecto de los productos de la RM (PRM) sobre el metabolismo mineral, ya que parece que estos compuestos pueden comportarse como polímeros aniónicos que forman complejos moderadamente estables con algunos minerales (Rendleman, 1987), capaces de afectar su biodisponibilidad. En este sentido, la bibliografía actual es escasa y contradictoria, y los resultados dependen en gran medida de los productos utilizados y de las condiciones experimentales. Trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en ratas demuestran que el consumo de dietas conteniendo mezclas de caseína-glucosa-fructosa calentada afectan la eliminación urinaria de zinc (Navarro et al., 2000) y calcio (Seiquer et al., 2001), mermando, en el primer caso, su digestibilidad y absorción.

A pesar de la existencia de datos que confirman la influencia de los PRM aminoácido-azúcar sobre la utilización de los minerales de la dieta, poco se sabe respecto al posible efecto de los PRM resultantes de la interacción aminoácido-lípido oxidado. Los únicos trabajos que pudieran estar relacionados a este respecto son los de García Arias et al. (1993), que observan descensos en la utilización del Zn en ratas alimentadas con dietas conteniendo atún procesado como fuente proteica y fuente parcial de grasa.

En los últimos años se ha incrementado el uso de los cultivos celulares para los estudios de nutrición. La línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, se diferencia espontáneamente en cultivo, exhibiendo características estructurales y funcionales de los enterocitos maduros, con las microvellosidades del borde en cepillo bien desarrolladas (Pinto et al., 1983). Diversos estudios han demostrado que las células Caco-2 proporcionan un modelo in vitro único para estudiar los aspectos moleculares del transporte de Ca (Gama et al., 1997; Fleet y Wood 1999; Seiquer et al., 2001) y de la captación y transporte de Zn (Navarro et al., 2000; Seiquer et al., 2000).

Los compuestos pardos procedentes de la reacción lípido oxidado-proteína han sido estudiados en cuanto a su actividad antioxidante (Alaiz et al., 1996, 1997), aunque, como ya se ha comentado, nada se sabe de sus efectos sobre el metabolismo mineral.

Por lo tanto, creemos que sería importante profundizar al respecto, ya que la oxidación de los PUFA es frecuente en el procesamiento de alimentos como el pescado, de alto contenido en C20:5n3, y en alimentos proteicos que se fríen con aceite. En este estudio se han seleccionado dos lípidos oxidados, el EH y el ED, por su alta reactividad con aminoácidos y proteínas y por estar los mecanismos de las reacciones y los compuestos obtenidos bien definidos (Zamora e Hidalgo, 1994, 1995; Hidalgo y Zamora, 1993).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la presencia de compuestos obtenidos en la reacción lípido oxidado-aminoácido sobre la absorción de zinc y calcio en células Caco-2, comparativamente con la que ejercen los derivados de la interacción azúcar-aminoácido.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Preparación de las muestras

Se utilizaron un total de 3 muestras, 2 de ellas resultado de la reacción entre lípidos peroxidados y el aminoácido lisina (muestras EH-L y ED-L, cedidas por el Dr. Hidalgo), y la tercera procedente de la reacción entre un azúcar reductor, la fructosa, y la lisina (muestra F-L, cedida por el Dr. Olano).

**EH-L.** La muestra EH-L se obtuvo como resultado de la reacción entre el 4,5 (E)-epoxy-2(E)-heptenal (EH) y la L-lisina monohidroclorehidrato, según describen Zamora e Hidalgo (1994). El EH, producto de la oxidación de los ácidos grasos n-3 pentaenoicos, se preparó a partir de 2(E)-4(E)-heptadienal, siguiendo el método descrito por Swoboda y Peers (1978).

**ED-L.** Se obtuvo según el método descrito por Zamora e Hidalgo (1995). Se utilizó 4,5 (E)-epoxy-2 (E)-decenal (ED), resultado de la oxidación del ácido linoleico (C18:2n6) y obtenido mediante una modificación del método descrito por Swoboda y Peers (1978). El aminoácido, como en el caso anterior, fue L-lisina monohidroclorehidrato.

**F-L.** La síntesis de  $\alpha$ -N-acetil-e-N-(1-desoxi-D-fructosil)- $\alpha$ -Lisina se llevó a cabo según describen Finot y Mauron (1969), y el producto resultante fue cedido amablemente por el Dr. Olano para la realización del presente ensayo.

### 2.2. Cultivos celulares

Las células Caco-2 fueron adquiridas a través de la European Collection of Cell Cultures (ECACC) en el pase número 20, y utilizadas en los experimentos entre los pases 32-37. Todos los medios de cultivo y los reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical Co. (Cambridge, MA). Los frascos para el mantenimiento de las células (75 cm<sup>2</sup>) fueron comprados a Corning Costar (Cambridge, MA). El medio de culti-

vo utilizado fue el Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM), enriquecido en glucosa (4.5 g/L), conteniendo suero bovino fetal (15%) inactivado por calor,  $\text{NaHCO}_3$  (3.7 g/L), aminoácidos no esenciales (1%), HEPES (15 mM), insulina bovina (0.1 UI/mL) y solución antibiótica-antimicótica (1%). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, en atmósfera aire/ $\text{CO}_2$  (95:5) con una humedad del 90%, y el medio de cultivo se renovó cada 3 días.

Alcanzada una confluencia de la monocapa del 70%, se comprobó la viabilidad de las células mediante tinción de exclusión con azul de tripano, que dio valores aceptables nunca inferiores al 90%. A continuación, se llevó a cabo la tripsinización y siembra de las células según se ha descrito en trabajos previos (Navarro et al., 2000; Seiquer et al., 2001). Brevemente, las células fueron recogidas y sembradas en placas bicamerales (Transwell, 24 mm de diámetro, 4.7 cm<sup>2</sup> de área, 3 µm de tamaño de poro, Costar), a una densidad de 100.000 células/cm<sup>2</sup>, con 2.5 mL de medio en la cámara basolateral y 1.5 mL en la cámara apical; el medio de cultivo se cambió cada dos días, y el día anterior a que las células fueran utilizadas para la realización de los experimentos.

Durante la diferenciación de las células Caco-2, se comprobó la formación de monocapas uniformes, con estrechas uniones entre las células. Para ello se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en los filtros de las placas bicamerales en distintos días desde la siembra, y el día previo a la realización de los experimentos, utilizando un aparato Millicell-ERS (Millipore). Se asume que valores bajos de TEER en una monocapa indican orificios o uniones imperfectas entre las células, lo cual la haría inútil para ser utilizada en estudios de transporte transcelular (Hidalgo y Borchardt, 1990). Las monocapas utilizadas en estos ensayos exhibieron valores adecuados de TEER en el momento previo a los experimentos, que oscilaron entre 500-650  $\Omega/\text{cm}^2$ .

### 2.3. Realización de los experimentos en cultivos celulares

Los experimentos para estudiar la influencia de los productos puros en la absorción de zinc y calcio se llevaron a cabo tras 21 días de la siembra en las placas bicamerales. El medio gastado se retiró de las cámaras apical y basolateral, y ambas superficies de las células fueron lavadas 3 veces con HBSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a 37°C. A continuación se añadieron 2.5 mL de solución de transporte a la cámara basolateral, consistente en NaCl 130 mmol/L, KCl 10 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  1 mmol/L, glucosa 5 mmol/L y HEPES 50 mmol/L, pH 7. En la cámara apical, cubriendo las monocapas de células, se adicionaron las distintas soluciones conteniendo las muestras objeto

del estudio y cuya composición se explica en el apartado siguiente.

**2.3.a. Captación y transporte de Zinc.** Se siguió la metodología descrita por Navarro et al. (2000). Para estos ensayos se prepararon 4 soluciones test diferentes, pero conteniendo la misma concentración de Zn (1 mM). La primera de ellas consistió en el medio de cultivo al que se le añadió Zn hasta conseguir la concentración deseada (DMEM-Zn). En las restantes se añadieron al DMEM-Zn las diferentes muestras (EH-L, ED-L y F-L) en una proporción de 0.8 mg/mL, obteniéndose las soluciones DMEM-Zn-EH-L, DMEM-Zn-ED-L y DMEM-Zn-F-L respectivamente, que fueron incubadas a 37°C hasta el momento de empezar los experimentos. Estas soluciones se adicionaron a la cámara apical en un volumen de 1.5 mL/pocillo, y los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda de aire/ $\text{CO}_2$  durante 12 h. Para determinar el contenido inicial de Zn en las células, también se llevaron a cabo ensayos con DMEM sin Zn añadido (0.008 mM Zn).

Tras el periodo de incubación se aspiró el medio del compartimento apical y se retiró el filtro con la monocapa de células, cuya superficie fue lavada 2 veces con buffer enfriado en hielo conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y HEPES 10 mM, pH 7, con el fin de retirar los metales unidos de forma no específica y el medio residual. El filtro con las células se separó del soporte y se reservó para determinar el Zn celular. El Zn transportado a través de la monocapa de células se calculó retirando la solución de la cámara basolateral, y lavando el pocillo dos veces con agua desionizada.

La viabilidad de las células tras 12 h de exposición a las distintas soluciones utilizadas, fue estudiada mediante tinción de exclusión con azul de tripano. Los porcentajes de viabilidad obtenidos se muestran en la Tabla I.

**2.3.b. Transporte de Calcio.** Se siguió la técnica descrita por Seiquer et al. (2001). Se prepararon 4 soluciones test diferentes, conteniendo la misma concentración de Ca (3 mM). La primera de ellas consistió en el medio de cultivo enriquecido en Ca (DMEM-Ca). Para preparar las restantes se añadieron al DMEM-Ca las diferentes muestras (EH-L, ED-L y F-L) en una proporción de 0.8 mg/mL, con lo que se obtuvieron las soluciones DMEM-Ca-EH-L, DMEM-Ca-ED-L y DMEM-Ca-F-L respectivamente. Las distintas soluciones fueron incubadas a 37°C hasta el momento de empezar los experimentos. En ellos, se adicionaron a la cámara apical en un volumen de 1.5 mL/pocillo, y los cultivos fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda de aire/ $\text{CO}_2$  durante 4 h. Para determinar la cantidad de calcio que atravesó la monocapa de células Caco-2, la solución de transporte fue retirada de la cámara basal y ésta se lavó dos veces con agua desionizada, con el fin de asegurar una recolección completa del mineral transportado.

Tabla I  
Porcentajes de viabilidad de las células Caco-2 tras la exposición a las distintas soluciones

Concentración de mineral	Tiempo de exposición	Solución <sup>a</sup>			
		DMEM	DMEM-EH-L	DMEM-ED-L	DMEM-F-L
1 mM Zn	12 h	88.6±3.61 <sup>a</sup>	84.6±6.10 <sup>ab</sup>	85.3±2.75 <sup>ab</sup>	75.7±6.46 <sup>b</sup>
3 mM Ca	4 h	89.7±3.31 <sup>a</sup>	86.5±4.81 <sup>a</sup>	90.3±5.12 <sup>a</sup>	84.9±2.77 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>DMEM, medio de cultivo; DMEM-EH-L, medio de cultivo conteniendo la muestra EH-L; DMEM-ED-L, medio de cultivo conteniendo la muestra ED-L; DMEM-F-L, medio de cultivo conteniendo la muestra F-L. Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P<0.05). Los valores representan la media ± SD de tres placas.

Como en el caso anterior, se estimó la viabilidad de las células ante las distintas soluciones; los valores se muestran en la Tabla I.

#### 2.4. Determinaciones analíticas

El análisis de los minerales se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 1100 B (Überlinger, Alemania). Los medios de cultivo, soluciones de transporte y monocapas de células Caco-2 fueron incinerados en horno (Selecta, 366, Barcelona, España) a 450°C; las cenizas obtenidas se disolvieron con HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:2).

En los análisis de Zn se utilizaron patrones externos de referencia de hígado bovino (BCR No.185; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), y se prepararon patrones de Zn a partir de 1 g/L (Titrisol, Merck).

Las determinaciones de Ca se realizaron utilizando lantano al 0.5% para evitar interferencias. El patrón externo de referencia fue leche bovina desnatada (BCR CRM 63), y los patrones se prepararon a partir de Ca 1 g/L (Titrisol, Merck). Se utilizó como blanco una solución de lantano de igual concentración que las muestras.

Todo el material de vidrio y de polietileno se lavó con ácido nítrico 10 N, y se utilizó agua Milli-Q (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp., Bedford, MA) sin excepciones.

#### 2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos con células Caco-2 se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de Duncan para comparar valores con variaciones significativas (P<0.05).

Tabla II  
Captación y transporte de Zn en células Caco-2 tras 12 h de exposición a las diferentes soluciones 1 mM Zn

Solución <sup>a</sup>	Transporte <sup>b</sup> (µg/pocillo)	% transporte <sup>b</sup>	Zn celular <sup>b</sup> (µg/pocillo)	% captación <sup>b</sup>
DMEM-Zn	27.68±3.75 <sup>a</sup>	28.22±3.82 <sup>a</sup>	16.34±1.34 <sup>a</sup>	16.16±1.37 <sup>a</sup>
DMEM-Zn-EH-L	6.80±1.75 <sup>b</sup>	6.93±1.79 <sup>b</sup>	3.92±0.27 <sup>b</sup>	3.49±0.28 <sup>b</sup>
DMEM-Zn-ED-L	17.53±1.62 <sup>c</sup>	17.87±1.65 <sup>c</sup>	4.40±0.26 <sup>b</sup>	4.19±0.63 <sup>b</sup>
DMEM-Zn-F-L	20.80±3.16 <sup>c</sup>	21.39±3.05 <sup>c</sup>	4.56±0.04 <sup>b</sup>	4.14±0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>DMEM-Zn, medio de cultivo; DMEM-Zn-A, medio de cultivo conteniendo la muestra A; DMEM-Zn-B, medio de cultivo conteniendo la muestra B; DMEM-Zn-C, medio de cultivo conteniendo la muestra C.

<sup>b</sup>Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

Los valores representan la media ± SD de al menos tres pocillos de un experimento representativo.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Viabilidad

El empleo de medio de cultivo (DMEM) como solución de transporte para los experimentos de absorción de distintos minerales, evita que se produzcan cambios metabólicos que alteren la captación y el transporte, especialmente de Zn (Finley et al., 1995). Además, incluso con concentraciones de Ca y Zn superiores a las normales para su mantenimiento, pero necesarias para la realización de estos ensayos, permite que la viabilidad de las células Caco-2 se mantenga en casi todos los casos en valores próximos al 85% (Tabla I), cifras que la bibliografía considera como aceptable para este tipo de experimentos (Reeves et al., 1996).

Los compuestos derivados de la acción de los radicales libres, como son los lípidos oxidados, están implicados en alteraciones moleculares que conducen a un daño celular, produciendo cambios en la morfología y viabilidad de las células (Sies, 1991; Manna et al., 1997; Giovannini et al., 1999). Como era de esperar, la adición de las muestras, en las que el complejo lípido oxidado-aminoácido ya está formado, no comprometió la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales. Hay que señalar, sin embargo, que en los ensayos de Zn, de mayor duración, el porcentaje de células viables descendió respecto del control cuando el DMEM contenía la muestra F-L, pero no varió significativamente en relación con las otras soluciones que incluían los restantes PRM.

#### 3.2. Ensayos de Zinc

Los resultados se muestran en la Tabla II. El transporte de Zn se expresó como microgramos de Zn transportados a la cámara basolateral por pocillo, y como porcentaje de Zn transportado por pocillo, a partir de la solución adicionada a la cámara apical. Aunque Zamora e Hidalgo (1995) consideran que en la muestra ED deben existir polímeros insolubles, tras la adición de las muestras al medio de cultivo no se observó la aparición de precipitado; aún así, su presencia supuso reducciones significativas en la cantidad y en el porcentaje de Zn que atravesó la monocapa de células Caco-2, mucho más marcadas cuando la muestra era EH-L.

El contenido celular de Zn se expresó como microgramos de Zn por pocillo, y la captación se calculó como porcentaje a partir de la solución de Zn inicial. El contenido basal de Zn en las células Caco-2 fue  $0.50 \pm 0.14 \mu\text{g/pocillo}$  ( $n = 3$ ). El contenido final y la captación de Zn en las células disminuyó significativamente con la adición de las muestras al medio de cultivo, sin diferencias significativas entre las distintas soluciones.

La capacidad de los PRM azúcar-aminoácido para acomplejar diversos minerales, entre los que se encuentra el Zn, ha sido demostrada tanto *in vitro* (O'Brien, 1988; Homma y Murata, 1994; Delgado-Andrade, 2002) como *in vivo* (Andrieux y Saquet, 1984; Lykken et al., 1986). Los complejos formados pueden ser solubles o insolubles, teniendo distinta reactividad según su estructura.

En este sentido se sabe que el Zn es capaz de formar complejos solubles en el lumen intestinal con PRM "clásicos" (procedentes de la reacción de proteínas, péptidos o aminoácidos con azúcares reductores) (O'Brien et al., 1994), siendo los compuestos pardos derivados de la lisina, respecto a los de otros aminoácidos, los de mayor capacidad para fijarlo (O'Brien y Morrissey, 1997). Por tanto, no sería de extrañar que los productos pardos, procedentes de la reacción lípido oxidado-lisina, también pudiesen quelar al Zn y así disminuir su captación. Esto se sugiere porque en células Caco-2 se ha demostrado que el Zn iónico difunde a través de ellas, mientras que el Zn ligado solo puede hacerlo cuando su afinidad por el transportador celular es superior a la del ligando presente en el medio (Finley et al., 1995). Hay que suponer que los complejos formados con los tres PRM empleados en este estudio han unido fuertemente al zinc, impidiendo su cesión a los transportadores celulares y, de este modo, han deteriorado su captación celular. De hecho, en trabajos previos con este mismo modelo experimental, la adición al medio de cultivo de otros PRM solubles, procedentes de la digestión de mezclas calentadas de caseína-glucosa-fructosa, también dio lugar a descensos muy similares en el Zn captado por las células (Navarro et al., 2000).

Mediante pruebas *in vivo*, estudios previos también indican que algunos productos pardos, resultantes del calentamiento de proteína-azúcar, fijan al Zn y aumentan su excreción fecal y/o urinaria, en función de que sean o no absorbidos (Furnis et al., 1989; Navarro et al., 2000). Por otra parte, alimentando a ratas con dietas a base de atún (rico en ácidos grasos n-3) esterilizado sin aceite, García Arias et al. (1993) observaron aumentos considerables en la excreción fecal y urinaria de Zn. Además, los autores pusieron de manifiesto que el proceso de esterilización disminuía significativamente los valores de lisina disponible (Castrillón et al., 1996) y, ya que la lisina es el aminoácido que más frecuentemente se pierde en el deterioro proteico producido por la peroxidación lipídica, podría suponerse que los compuestos formados entre los lípidos oxidados y la lisina habrían afectado la utilización de Zn *in vivo*. Nuestros actuales resultados apoyan esta hipótesis, al observar una disminución de la cantidad de Zn que atravesó la monocapa de células Caco-2, especialmente importante cuando el medio de cultivo contenía la muestra EH-L, que era precisamente la

que procedía de la oxidación de los PUFAs de la serie n-3.

### 3.3. Ensayos de Calcio

El transporte de Ca se expresó de igual forma que se ha explicado para el Zn, esto es, como cantidad absoluta que atravesó la monocapa de células y como porcentaje de Ca transportado (Tabla III). Al contrario de lo que ocurría con el Zn, la presencia en el medio de cultivo de las distintas muestras ensayadas en ningún caso produjo variaciones significativas en la cantidad de Ca transportado a la cámara basolateral.

La capacidad de los compuestos pardos producidos en la RM para formar complejos con el calcio ha sido descrita hace años (Rendleman, 1987). En función de su poder quelante, algunos PRM podrían afectar la absorción cálcica por un doble mecanismo: los compuestos de elevado peso molecular, insolubles, disminuirían su absorción; mientras que las premelanoidinas y melanoidinas solubles, al quelar al elemento y mantenerlo en solución, incluso la favorecerían. Este último hecho, según algunos autores, no se corresponde con aumentos en la utilización metabólica de Ca, ya que en forma de complejos no siempre resulta utilizable y, consecuentemente, su excreción urinaria aumenta (Yuan y Kitts, 1994).

La capacidad de ciertos PRM solubles o insolubles para unirse al Ca va a depender de los reactantes y de las características de la reacción, aunque los estudios previos señalan que su afinidad por este micronutriente es escasa, comparado con otros elementos. Así, por ejemplo, los pigmentos pardos del café o los del pan tostado sin leche, presentan muy baja capacidad para fijar al Ca (Rendleman, 1987). En la misma línea, O'Brien y Morrissey (1997) indican que mientras se conocen mejor los ligandos que

fijan al Zn o al Cu, no se ha establecido la identidad de los PRM capaces de acomplejar al Ca; además, aunque la afinidad de los PRM para unir a distintos minerales no está bien definida, sugieren un orden en el que el Ca ocuparía el último lugar.

En nuestras condiciones experimentales no se observó la aparición de precipitado por la presencia de las muestras en el medio de cultivo, de lo que se deduce que no se formaron complejos insolubles que entorpecieran la absorción de Ca. Los complejos solubles, si los hubo, tampoco tuvieron efectos significativos sobre la absorción del mineral. Esto concuerda con resultados recientes de nuestro grupo de investigación en los que, utilizando productos pardos resultantes del calentamiento de mezclas de glucosa-lisina, no se observaron cambios en la solubilidad del elemento ni tampoco modificaciones en el transporte de Ca a través de las células Caco-2 (Delgado-Andrade, 2002). En estos ensayos no apareció el efecto facilitador de la lisina sobre la utilización de Ca (Wapnir, 1990), ni tampoco en los del presente trabajo, aunque en EH-L y en ED-L existe una parte de aminoácido libre que no ha reaccionado (Zamora e Hidalgo 1994, 1995). Hay que añadir, además, que en ensayos biológicos realizados en animales alimentados con dietas conteniendo productos pardos, los valores de absorción y retención de calcio no varían significativamente (Andrieux y Sacquet, 1984; Seiquer et al., 2001).

La existencia de EH ha sido detectada en homogenizados de pescado (Zamora e Hidalgo, 1994), por lo que la formación de productos resultantes de la interacción EH-lisina parece probable en pescados grasos procesados (fritos o enlatados). A este respecto, podemos indicar que en ensayos llevados a cabo en ratas, no se observan modificaciones en la utilización digestiva del Ca cuando la dieta contiene sardina frita o enlatada (Pérez, 1990); al utilizar conservas de atún como fuente proteica de la dieta no

Tabla III  
Transporte de Ca en células Caco-2 tras 4 h de exposición a las diferentes soluciones 3 mM Ca

Solución*	( $\mu\text{g/pocillo}$ )	%
DMEM-Ca	27.63 $\pm$ 2.80	15.32 $\pm$ 1.55
DMEM-Ca-EH-L	23.11 $\pm$ 5.23	12.80 $\pm$ 2.90
DMEM-Ca-ED-L	25.71 $\pm$ 2.68	14.25 $\pm$ 1.48
DMEM-Ca-F-L	28.19 $\pm$ 4.42	15.62 $\pm$ 2.45

\*DMEM-Ca, medio de cultivo; DMEM-Ca-EH-L, medio de cultivo conteniendo la muestra EH-L; DMEM-Ca-ED-L, medio de cultivo conteniendo la muestra ED-L; DMEM-Ca-F-L, medio de cultivo conteniendo la muestra F-L.  
Los valores representan la media  $\pm$  SD de al menos tres pocillos de un experimento representativo. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

se producen modificaciones en las excreciones urinaria o fecal de calcio, ni tampoco se afectan la absorción o la retención cálcica (García Arias et al., 1994). Lo anteriormente descrito muestra que existe una concordancia entre los resultados obtenidos in vitro en células Caco-2 en los presentes ensayos, y los existentes en ensayos in vivo con animales de experimentación.

Por otra parte, algunos autores, utilizando sacos evertidos de ratas, han mostrado reducciones en el transporte duodenal e ileal de calcio causadas por PRM, sugiriendo la posibilidad de una cierta inhibición del metabolismo del enterocito ante estos compuestos (O'Brien et al., 1988). Sin embargo, los productos ensayados en el presente trabajo no parecen inhibir el metabolismo de las células Caco-2, al menos en lo que al transporte de calcio se refiere.

#### 4. CONCLUSIONES

Igual que se atribuye a los PRM considerados "clásicos", los derivados de la interacción lípido-oxidado-lisina parecen tener cierta capacidad para alterar la disponibilidad mineral, incidiendo, como aquellos, preferentemente sobre los elementos traza. Los resultados muestran un comportamiento similar de las muestras lípido-aminoácido respecto a la de azúcar-aminoácido en cuanto a la absorción in vitro de Zn y Ca.

Por otra parte, también en los productos de la reacción aminoácido-lípido oxidado se observa la especificidad de los productos obtenidos dependiente de los reactantes empleados. Así, los derivados de la reacción en la que participa el EH resultan más negativos para la disponibilidad del Zn.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Drs. Hidalgo y Olano por la desinteresada cesión de las muestras utilizadas en este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Alaiz, M., Hidalgo, F.J. y Zamora, R. (1997). Antioxidative activity of nonenzymatically browned proteins produced in oxidized lipid/protein reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1365-1369.
- Alaiz, M., Zamora, R. e Hidalgo, F.J. (1996). Contribution of the formation of oxidized lipid/amino acid reaction products to the protective role of amino acids in oils and fats. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1890-1895.
- Andrieux, C. y Sacquet, E. (1984). Effect of Maillard's reaction products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive tract. The role of microflora. *Reprod. Nutr. Develop.*, **24**, 379-386.
- Beamonte, A. y Castrillón, A.M. (1989). Variaciones en el contenido de triptófano en sardina (*Clupea Pilchardus*) originadas por los procesos térmicos culinarios. Papel de la grasa. *Grasas y Aceites*, **40** (3), 194-198.
- Castrillón, A.M., Navarro, P., y García Arias, M.T. (1996). Tuna protein nutritional quality changes after canning. *J. Food Sci.*, **61**, 1250-1253.
- Delgado-Andrade, C. (2002). Reacción de Maillard: su influencia sobre la biodisponibilidad mineral. Tesis Doctoral. ISBN: 84-607-4520-1. Universidad de Granada.
- Finley, J.W., Briske-Anderson, M. Reeves, P.G. y Johnson, L.A. (1995). Zinc uptake and transcellular movement by Caco-2 cells: studies with media containing fetal bovine serum. *J. Nutr. Biochem.*, **6**, 137-144.
- Finot, P.A., Mauron, J. (1969). Le blocage de la lysine par la reaction de Maillard. I. Synthese de N-(desoxy-1-D-fructosyl-1)- et N-(desoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysines. *Helvetica Chimica Acta*, **52** (6), 1488-1495.
- Fleet, J.C. y Wood, R.J. (1999). Specific 1, 25(OH) 2D3-mediated regulation of transcellular calcium transport in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*, **276**, G958-G964.
- Furnis, D.E.; Vuichoud, J.; Finot, P.A. y Hurrell, F. (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.*, **62**, 739-749.
- Gama, L.; Baxendale-Cox, L.M. y Breitwieser, G.E. (1997). Ca<sup>2+</sup>-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.*, **273**, C1168-C1175.
- García Arias, M.T., Castrillón, A.M. y Navarro, P. (1993). Bioavailability of zinc in rats fed on tuna as a protein source of the diet. *J. Trace Elem. and Electrol. In Health and Disease*, **7**, 29-36.
- García Arias, M.T., Castrillón, A.M., y Navarro, P. (1994). Protein, calcium and phosphorus utilization in diets containing raw, caged or canned tuna. Influence of 1 and 3 year's storage time. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **45**, 237-247.
- Gardner, H.W. y Selke, E. (1984). Volatiles from thermal decomposition of isomeric methyl (12S,13S)-(E)-12,13-epoxy-9-hydroperoxy-10-octadecenoates. *Lipids*, **19**, 375-380.
- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., De Vincenzi, M., Malorni, W. y Masella, R. (1999). Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in caco-2 cells. *J. Nutr.*, **129**, 1269-1277.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R. y Alaiz, M. (1992). Modificaciones producidas en las proteínas alimenticias por su interacción con lípidos peroxidados. II. Mecanismos conocidos de la interacción lípido (oxidado)-proteína. *Grasas y Aceites*, **43**, 31-38.
- Hidalgo, F.J. y Zamora, R. (1993). Non-enzymatic browning and fluorescence development in a (E)-4,5-Epoxy-(E) 9-2-heptenal/Lysine model system. *J. Food Sci.*, **58**, 667-670.
- Hidalgo, U. y Borchardt, R.T. (1990). Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1035**, 97-103.
- Homma, S.; Murata, M. (1994). Characterization of metal chelating compounds in soluble coffee. En Maillard Reaction in Chemistry, Food and Health. Ed Labuza, TP, Reineccius GA, Monnier V, OBrien J y Baynes J, The Royal Society of Chemistry, p. 413.
- Karel, M. (1984). *J. Chem. Educ.*, **61**, 335-339.
- Lykken, G.I., Mahalko, J., Johnson, P.E., Milne, D., Sandstead, H.H., García, W.J., Dinitzis, F.R. e Inglett, G.E. (1986). Effect of browned and unbrowned corn products intrinsically labeled with <sup>65</sup>Zn on absorption of <sup>65</sup>Zn in humans. *J. Nutr.*, **116**, 795-801.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A. y Zappia, V. (1997). The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts

- reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in caco-2 cells. *J. Nutr.*, **127**, 286-292.
- Mauron, J. (1985). Influence of processing on protein quality. *Bibli. Nutr. Dieta*, **34**, 56-81.
- Navarro, P., Aspe, T. y Seiquer, I. (2000). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3589-3596.
- Navarro, P.; García Arias, M.T. y Castrillón, A.M. (1988). Valoración de lisina disponible en caseína sometida a un proceso térmico en presencia y ausencia de aceite. *CICC*, **3**, 8-10.
- O'Brien, J. (1988). Nutritional and toxicological aspects of the Maillard Browning Reaction. Ph.D. Thesis. National University of Ireland.
- O'Brien, J. y Morrissey, P.A. (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard Reaction. *Food Chem.*, **58**, 17-27.
- O'Brien, J.; Morrissey, P.A. y Flynn, A. (1988). Nephrocalcinosis and disturbances of mineral balance in rats fed Maillard reaction products. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Processing*. R. Walker, E. Quattrucci, Eds. Taylor and Francis, London, UK, , pp. 177-185.
- O'Brien, J.M.; Morrissey, P.A. y Flynn, A. (1994). Alterations of mineral metabolism and secondary pathology in rats fed Maillard Reaction Products. En *Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health*. The Royal Society of Chemistry, Ed.; Thomas Graham House, Science Park, Cambridge, UK, pp 397-401.
- Pérez Álvarez-Quinones, M. (1990). El proceso de enlatado en sardinas. Repercusiones nutricionales y sensoriales de la fritura y de las diferentes fases de elaboración y maduración. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M.D.; Kendinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, E.; Simon-Assman, P.; Haffen, K.; Fogh, J. y Zweibaum, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, **47**, 323-330.
- Pokorny, J. (1980). Effects of substrates on changes of fats and oil during frying. *Rev. Ital. Sostanze Grasse*, **LVII**, 222-225. *J. Food. Sci.* **29**, 350-354.
- Reeves, P.G.; Briske-Anerson, M.; Newman, S.M. (1996). High zinc concentration in culture media affects copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *J. Nutr.* **126**, 1701-1712.
- Rendleman, J.A. (1987). Complexation of calcium by melanoidin and its role in determining bioavailability. *J. Food Sci.* **6**, 52, 1699-1705.
- Seiquer, I., Aspe, T., Vaquero, P. y Navarro, P. (2001). Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: in vitro and in vivo assays. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1049-1055.
- Seiquer, I., Valverde, A., Delgado-Andrade, C. y Navarro, P. (2000). Influence of heat treatment of casein in presence of reducing sugars on Zn solubility and Zn uptake by Caco-2 cells after in vitro digestion. *J. Physiol. Biochem.* **56**, 237-246.
- Sies, H. ed. (1991). Oxidative stress, oxidants and antioxidants. Academic Press, New York, NY.
- Swoboda, P.A.T. y Peers, K.E. (1978). *Trans*-4-5-Epoxyhept-*trans*-2-enal. The major volatile compound formed by the copper and alpha.tocopherol induced oxidation of butterfat. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 803-807.
- Wapnir, R.A. (1990). Calcium, Magnesium and phosphorus absorption, nutritional status and effects of proteins. En *Protein nutrition and mineral absorption*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp.77-97.
- Yuan, Y.V. y Kitts, D.D. (1994). Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. *Br. J. Nutr.* **71**, 583-603.
- Zamora, R. e Hidalgo, F.J. (1994). Modification of lysine amino groups by the lipid peroxidation product 4,5(E)-Epoxy-2(E)-heptenal. *Lipids*, **29**, 243-249.
- Zamora, R. e Hidalgo, F.J. (1995). Linoleic acid oxidation in the presence of amino compounds produces pyrroles by carbonyl amine reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1258**, 319-327.

Recibido: Abril 2002  
Aceptado: Febrero 2003